大猿叶虫四地理种群遗传多样性的 RAPD 分析

魏晓棠[1,2]，肖海军[3]，刘云国[2]，薛芳森[3]，王英超[2]，张京萱[4]，包振民[1,*]
（1. 中国海洋大学海洋生命学院，山东青岛 266003；2. 山东出入境检验检疫局，山东青岛 266002；
3. 江西农业大学昆虫研究所，南昌 330045；4. 烟台出入境检验检疫局，山东烟台 264000）

摘要：以大猿叶虫 *Colaphellus bowringi* Baly 4 个地理种群的基因组 DNA 为材料，进行 RAPD 分析。从 80 条引物中筛选出 11 条稳定性好、多态性高的引物进行扩增，共得到 65 个扩增位点，53 个多态位点，Nei 氏遗传多样性指数为 0.1049～0.2061，Shannon 多样性指数为 0.1641～0.3167。结果表明所分析的大猿叶虫遗传变异很高，其中江西龙南种群遗传变异最小，山东泰安种群遗传变异最高。种群间的遗传距离范围为 0.0636～0.3200，其中江西龙南种群和江西修水种群间的遗传距离最小，哈尔滨种群与江西龙南种群间的遗传距离最大，种群遗传距离的大小与其相对地理距离的远近吻合。结果提示种群遗传距离的大小与它们生物学上的相似性有关联。

关键词：大猿叶虫；地理种群；遗传多样性；遗传距离；RAPD
中图分类号：Q968.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)06-0672-07

Genetic diversity of four geographical populations of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) revealed by RAPD

WEI Xiao-Tang[1,2], XIAO Hai-Jun[3], LIU Yun-Guo[2], XUE Fang-Sen[3], WANG Ying-Chao[2], ZHANG Jing-Xuan[4], BAO Zhen-Min[1,*] (1. Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266002, China; 3. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 4. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: The genetic diversity of four geographical populations of *Colaphellus bowringi* Baly was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Sixty-five amplified loci and 53 polymorphic loci were obtained using 11 primers selected from 80 random primers. The Nei's genetic diversity and Shannon genetic diversity indexes of the 4 populations were 0.1049－0.2061 and 0.1641－0.3167, respectively. The results showed the genetic diversity of the assayed populations was high, of which Tai'an population of Shandong (SDT) has the highest level of the genetic diversity, while Longnan population of Jiangxi (JXL) has the lowest. The genetic distances ranged from 0.0636 (between Longnan population of Jiangxi and Xiushui population of Jiangxi) to 0.3200 (between Longnan population of Jiangxi and Harbin population) among the 4 populations, indicating that the genetic distances among *C. bowringi* populations match with their geographical distances. The results suggest that the genetic distance might be correlated with their biological similarity.

Key words: *Colaphellus bowringi*; geographical populations; genetic diversity; genetic distance; RAPD

大猿叶虫 *Colaphellus bowringi* Baly 属鞘翅目(Coleptera)叶甲科(Chrysomelidae)无缘叶甲属 *Colaphellus*，是一种分布广泛的十字花科蔬菜害虫。国内分布北起黑龙江(嫩江)、内蒙古，南至海南及广东、广西南缘(章士美和赵泳祥，1996)。该虫以成虫和幼虫取食十字花科蔬菜的叶片，以成虫在土中越冬和越夏。目前国内已对大猿叶虫江西龙南(24°9′N，114°8′E)、江西修水(29°1′N，114°4′E)、山东泰安(36°2′N，117°1′E)和哈尔滨(45°8′N，126°6′E)种群的生物学和滞育特性进行了较详

基金项目：国家自然科学基金项目(30460074)
作者简介：魏晓棠，女，1971 年 12 月生，主要从事植物检疫工作，E-mail：weixiaotang2001@163.com
通讯作者 Author for correspondence, E-mail：zmbao@ouc.edu.cn
收稿日期 Received：2008-12-31；接受日期 Accepted：2009-04-17

细的研究(薛芳森等，2002；Xue *et al.*，2002；Wang *et al.*，2004，2006；董宇奎等，2007；Yang *et al.*，2007；Lai *et al.*，2008；胡志风等，2008)，揭示了这4个不同地理种群在生活史和滞育特性存在以下差异：(1)龙南、修水和山东种群的繁殖和为害出现在春季和秋季，以成虫在土中越夏和越冬，一年发生多代；而哈尔滨种群繁殖和危害主要出现在夏季，无夏眠现象，一年主要发生1代。(2)龙南和修水种群有光周期反应，是短日照型种类(长日照能诱导夏季滞育)；而山东和哈尔滨种群无光周期反应，滞育诱导主要取决于温度。(3)4个地理种群对温度的敏感性均显示了差异：龙南种群在温度≤18℃时全部个体进入滞育；修水种群在温度≤20℃时全部个体进入滞育；山东种群在温度<25℃时全部个体进入滞育；哈尔滨种群在温度≤28℃时全部个体进入滞育。(4)龙南、修水和山东种群进入越冬的个体，大多数分散在两年内的春夏两季出土繁殖，而哈尔滨种群当年进入越冬的个体，第二年全部出土繁殖。这些结果表明大猿叶虫不同地理种群已形成各自的地理适应机制，也反映了物种种群对于环境选择压力的反应，为开展大猿叶虫遗传多样性的研究提供了理想的材料。

随机扩增多态性 DNA (RAPD)已经成为一种非常成熟的分子标记技术，它以 DNA 聚合酶链式反应(PCR)为基础，利用一段任意寡聚脱氧核糖核苷酸单链片段(长度通常为8~10 bp)作为引物，基因组 DNA 的一系列不同随机引物的结合位点上或位点之间发生碱基插入、缺失，都会引起 PCR 扩增产物在数量和长度上不同，从而产生多态。RAPD 可用于构建基因指纹图谱，并可在对物种从未进行过任何分子生物学研究的基础上开展地毯式多态分析，从而两个基因组间的微小差异也能被反映出来。目前该方法在鞘翅目昆虫的遗传多样性分析中已有广泛应用(Cravanzola *et al.*，1997；Taberner *et al.*，1997；Bas *et al.*，2000；Scataglini *et al.*，2000；Kim and Sappington，2004；Magana *et al.*，2007)。本研究采用 RAPD 方法，探讨大猿叶虫4个地理种群的遗传结构和遗传多样性，为大猿叶虫生物多样性的评价提供分子生物学方面的数据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

于2006年4-5月采集大猿叶虫4个地理种群，每个种群随机抽取16个个体，共64个个体(具体采集情况见表1)。所有样品放入无水乙醇中，-20℃保存备用。

表1　大猿叶虫种群、采样地、采样数及地理坐标

Table 1 Population locality, sample size and geographical coordinates of *Colaphellus bowringi*

种群代码 Population code	采样地点 Sampling locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	采样时间 Sampling date	样品数 Sample size
JXL	江西龙南 Longnan, Jiangxi	24°9′ N	114°8′ E	2006-04	16
JXX	江西修水 Xiushui, Jiangxi	29°1′N	114°4′E	2006-04	16
SDT	山东泰安 Tai'an, Shandong	36°2′ N	117°1′ E	2006-05	16
HLB	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	45°30′N	126°6′ E	2006-05	16

1.2　基因组 DNA 的提取

剪取大猿叶虫个体的足和前胸，置于1.5 mL Eppendorf 管中加入液氮磨碎，利用 Boyce 等(1998)提供的方法，分别提取单个个体的基因组 DNA。

1.3　RAPD 反应体系及反应条件

利用 OPA,OPB,OPQ 和 OPH 系列引物共80条(由美国 Operon 公司生产)。

反应总体积为25 μL，内含10×buffer 2.5 μL，2 μL dNTP(2.5 mmol/L)，2 μL $MgCl_2$(25 mmol/L)，1 μL 引物(10 pmol/μL)，0.3 μL Taq 酶 (1.5 U)，1 μL (20~30 ng) 模板 DNA，无菌水17.2 μL。

反应条件为：94℃预变性3 min，45个循环(94℃变性30 s，36℃退火30 s，72℃延伸90 s)，72℃延伸10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳(80 V，55 min)，然后用核酸凝胶成像系统观察拍照。

1.4　数据处理

首先将电泳图谱中扩增条带的有无转化为0、1原始数据矩阵。利用 Popgene 3.2 对4个种群进行遗传多样性分析。按 Nei 和 Li(1979)的公式计算个体间遗传相似性指数和遗传距离，参考 Wachira 等(1995)公式计算 Shannon 多样性指数；对种群中的

遗传变异来源进行 AMOVA 分析(Arlequin 2001, Schneider)。根据种群间或个体间遗传距离矩阵,用 MEGA3.16 软件构建 UPGMA 系统树。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

从 80 条引物组合中筛选出条带清晰、重复性较好的 11 条引物(表 2)对大猿叶虫 4 个地理种群 64 个个体的 DNA 进行了 RAPD 扩增。共产生 65 个 DNA 片段,扩增片段大小为 0.15 ~2.5 kb。不同引物在不同种群中产生的片段数量不同,产生的扩增条带 2 ~8 条不等,每条引物平均扩增出 5.55 条带,扩增产物表现出较好的多态性。从 RAPD 指纹图谱可以看出,引物在类群间可以显示出特异性的谱带(图 1,图 2)。

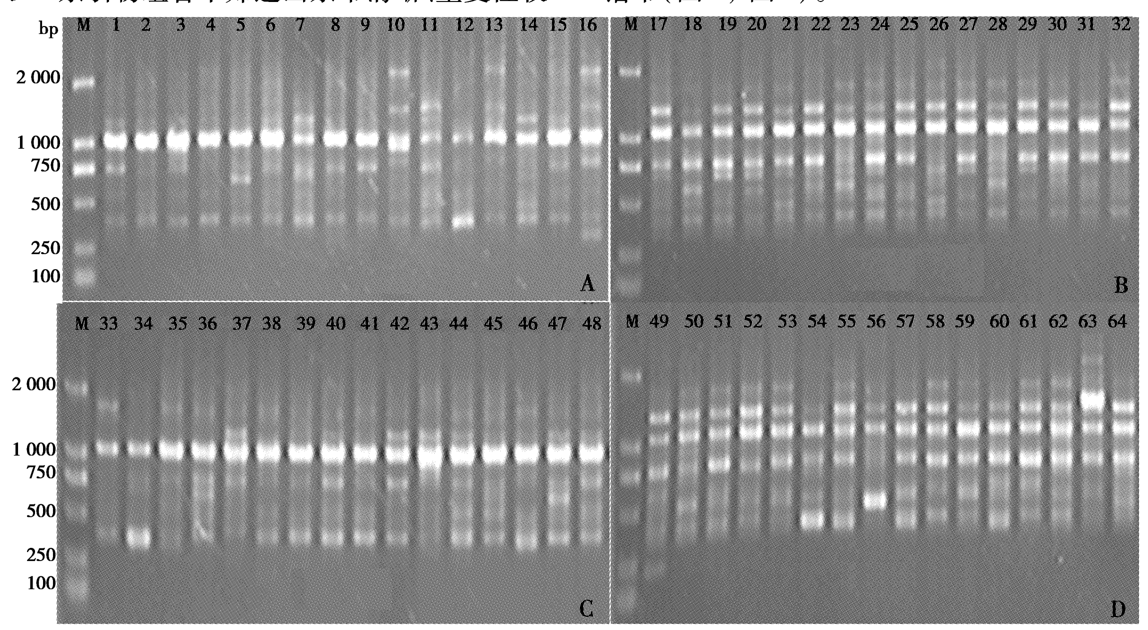


图 1 以 OPA6 为引物对大猿叶虫 4 个种群的 RAPD 分析

Fig. 1 RAPD analysis by primer OPA6 for four geographical populations of *Colaphellus bowringi*

M: DNA 标准分子量 DNA standard molecular weight marker; A(1 -16):哈尔滨种群 Harbin population; B(17 -32):江西龙南种群 Longnan population of Jiangxi; C(33 -48):山东泰安种群 Tai'an population of Shandong; D(49 -64):江西修水种群 Xiushui population of Jiangxi. 图 2 同 The same for Fig. 2.

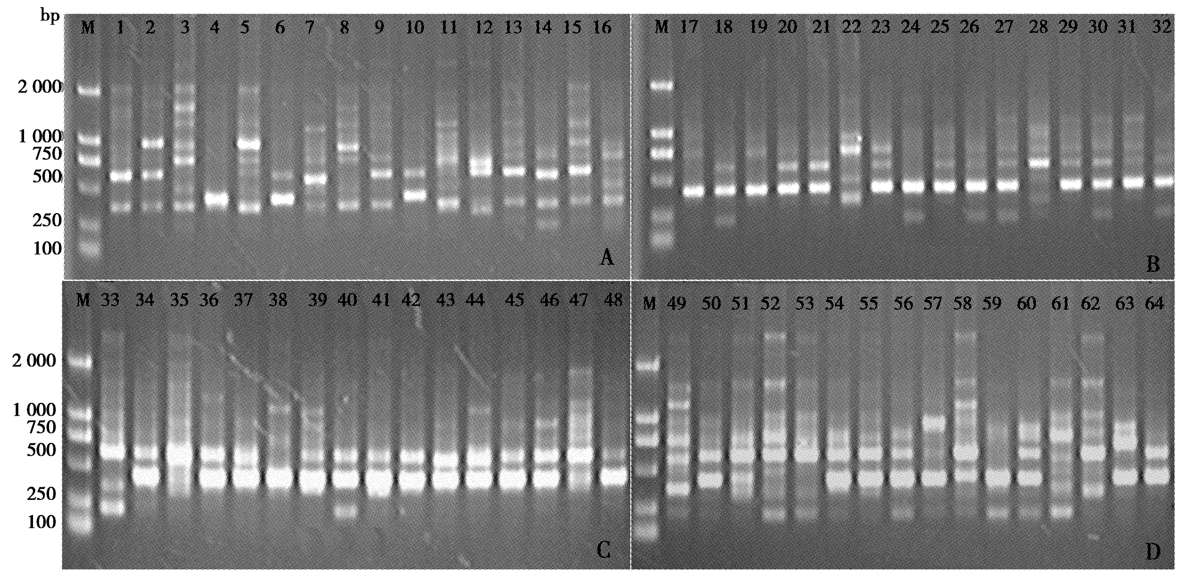


图 2 以 OPQ19 为引物对大猿叶虫 4 个种群的 RAPD 分析

Fig. 2 RAPD Analysis by primer OPQ19 for four geographical populations of *Colaphellus bowringi*

2.2　种群的遗传多态性

应用 11 条引物组合从 4 个种群中共得到 65 个扩增位点，其中多态位点为 53 个，多态位点比率从 50% ~ 100%，平均每条引物产生的多态位点为 4.82个，随机引物间表现出不同程度的多态性，平均多态位点比率为 81.54%（表 2），说明遗传变异很高。多态位点分析表明，4 个地理种群的多态位点百分率分别为：哈尔滨种群 61.54%、山东泰安种群 67.69%、江西修水种群 61.54%、江西龙南种群 36.92%。遗传多样性指数分析表明，Nei 氏遗传多样性指数为 0.1049 ~ 0.2061，Shannon 多样性指数为 0.1641 ~ 0.3167（表 3）。各种多态性指数表明，江西龙南种群遗传多样指数最低，山东泰安种群最高。

表 2　RAPD 中 11 个随机引物的扩增结果

Table 2 The sequences and amplified results of 11 random primers

引物代码 Primer code	引物碱基序列 Sequence (3′→5′)	扩增位点数 Amplified loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比例(%) Percentage of polymorphic loci
OPA-06	GGTCCCTGAC	5	4	80.00
OPA-07	GAAACGGGTG	7	7	100
OPB-14	TCCGCTCTGG	7	6	85.71
OPH-02	TCGGACGTGA	6	3	50.00
OPH-06	ACGCATCGCA	5	4	80.00
OPH-15	AATGGCGCAG	5	3	60.00
OPH-16	TCTCAGCTGG	5	4	80.00
OPQ-09	GGCTAACCGA	7	5	71.43
OPQ-11	TCTCCGCAAC	5	5	100
OPQ-19	CCCCCTATCA	5	5	100
OPQ-20	TCGCCCAGTC	8	7	87.50
总计 Total		65	53	81.54

表 3　大猿叶虫 4 个种群的 Nei 氏遗传多样性指数和 Shannon 多样性指数

Table 3 Nei's genetic diversity and Shannon diversity based on RAPD data in four populations of *Colaphellus bowringi*

	JXL	JXX	SDT	HLB
Nei 氏遗传多样性指数 Nei's genetic diversity	0.1049	0.1709	0.2061	0.1903
Shannon 多样性指数 Shannon diversity	0.1641	0.2710	0.3167	0.2948

2.3　种群间的遗传距离指数和遗传相似系数

统计 11 个多态引物的扩增结果，计算遗传相似性指数和遗传距离指数，结果见表 4。大猿叶虫 4 个地理种群间的遗传相似度的变异范围为 0.7262 ~ 0.9384，遗传距离指数为 0.0636 ~ 0.3200，平均遗传距离指数为 0.2330。其中，江西龙南种群和江西修水种群间的遗传距离最小，为 0.0636；其次是山东泰安种群与哈尔滨种群间的遗传距离，为 0.1372；哈尔滨种群与江西龙南种群间的遗传距离最大，为 0.3200。

表 4　大猿叶虫 4 个种群间的遗传距离指数（下三角）和遗传相似度（上三角）

Table 4 The genetic distance (below diagonal) and Nei's genetic identity (above diagonal) for four geographical populations of *Colaphellus bowringi*

种群 Population	JXL	JXX	SDT	HLB
JXL	–	0.9384	0.7301	0.7262
JXX	0.0636	–	0.7769	0.7332
SDT	0.3146	0.2525	–	0.8718
HLB	0.3200	0.3103	0.1372	–

2.4　种群遗传结构与遗传分化

根据 RAPD 扩增数据，利用 Arliquen 软件对大猿叶虫 4 个种群进行 AMOVA 分析，结果显示大猿叶虫 49.18% 的变异来源于种群间，50.82% 的变异来源于种群内（表 5）。

表 5 大猿叶虫种群的 AMOVA 分析数据

Table 5 Data derived from AMOVA of populations of *Colaphellus bowringi*

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	方差总和 Sum of squares	变异组分 Variance components	所占比例(%) Percentage of variation
种群间 Among populations	3	288.109	5.638 a	49.180
种群内 Within populations	60	349.562	5.826 b	50.820
总计 Total	63	637.672	11.464	

不同小写字母表示差异极显著($P<0.0001$)。Data followed by different lowercase letters are significantly different ($P<0.0001$).

2.5 大猿叶虫 4 个地理种群间的聚类关系

根据遗传距离的大小，应用 MEGA3.1 中 UPGMA 的建树方法对大猿叶虫 4 个种群及所有个体进行系统进化分析，种群间聚类图(图 3)与个体间聚类图(图 4)相符。从聚类图可以看出，个体间基本以地理种群进行类聚，4 个种群分为 2 枝，山东泰安种群与哈尔滨种群为一枝，江西龙南种群和修水种群为另一枝。表明江西龙南种群与江西修水种群的相似性最高，哈尔滨种与山东泰安种群间次高，龙南种群与哈尔滨种群间最低。

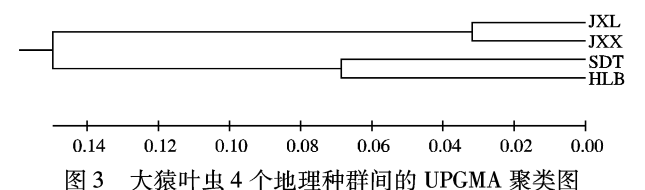


图 3 大猿叶虫 4 个地理种群间的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram among four geographical populations of *Colaphellus bowringi*

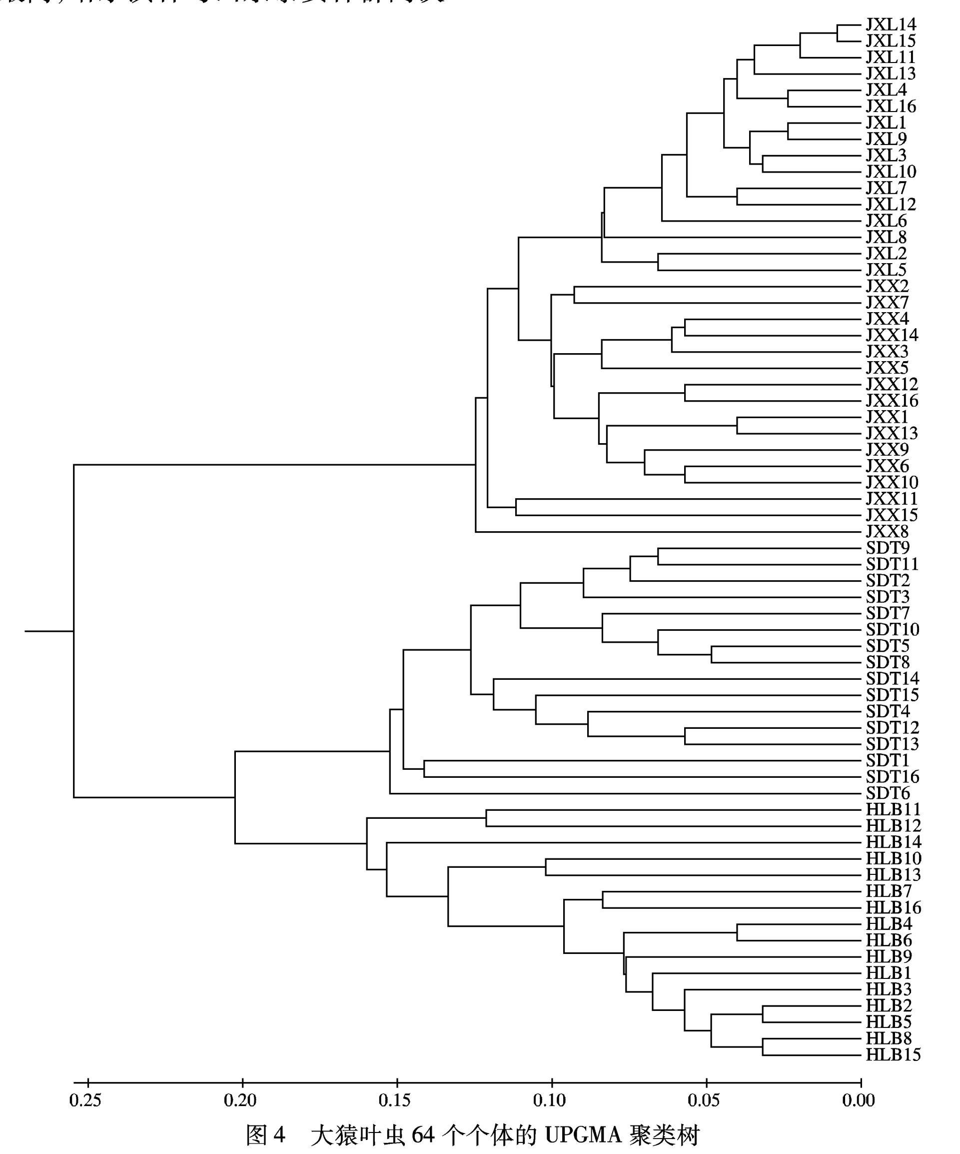


图 4 大猿叶虫 64 个个体的 UPGMA 聚类树

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 64 individuals of *Colaphellus bowringi*

3 讨论

一个物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关，遗传多样性的降低可导致其适应能力降低，有害隐性基因增加及经济性状衰退，最终导致种质退化，而丰富的遗传多样性意味着比较高的适应生存能力。大猿叶虫在我国是一种广泛分布的害虫，及时开展其种群遗传多样性研究可以为其综合防治提供遗传学依据。本研究采用 RAPD 技术对大猿叶虫 4 个地理种群的遗传多样性进行研究，4 个种群显示了较大的遗传差异。种群聚类图显示江西龙南种群和江西修水种群间的遗传距离最小，其次是山东泰安种群与哈尔滨种群间的遗传距离，哈尔滨种群与江西龙南种群间的遗传距离最大。种群间的遗传距离与其相对地理距离远近吻合，遗传相似度与它们生物学上的相似性有关联，如江西龙南种群与江西修水种群间的遗传距离最小，反映了这两个种群生物学上非常相似，均显示了短日照型的光周期反应及对温度的高度敏感，化性也一样。

另一方面，大猿叶虫在不同地理纬度上的适应性及其导致的生活史的多样性也是种群间遗传多样性差异较大的原因。哈尔滨种群一年主要发生 1 代，繁殖和为害出现在夏季，成虫的滞育是在夏季诱导的。山东泰安种群一年发生 2 代，春季和秋季各繁殖 1 代，以成虫越夏和越冬，越夏和越冬的滞育是在较低的温度下诱导的。江西修水种群和龙南种群一年可发生 4 代，春季 1 代，以成虫越夏；秋季可繁殖 3 代，以成虫越冬，越夏和越冬的滞育也是由较低的温度诱导的。不同生活史的差异是由不同的滞育特性引起的，随纬度由高到低显示了明显的地理变异(Lai *et al*., 2008)。大猿叶虫 4 个种群遗传多样性的大小与其滞育特性及生活史的变异程度基本呈现一种负相关，如低纬度地区种群(江西龙南种群和江西修水种群)的遗传多样性较低，其滞育特性及生活史的变异程度却比较大，其原因有待进一步研究。

大猿叶虫为非迁飞性害虫，仅以成虫在当地土壤中越冬。本实验的结果表明，大猿叶虫不同地理种群之间已经产生了一定程度的遗传分化。不同地理种群之间的遗传距离显示，遗传距离与各种群之间的地理距离有关。由于不同地理种群之间的地理隔离，导致其间基因流不同程度的阻断，地理距离越远，遗传距离越大，地理距离越近，遗传距离越小。江西龙南与哈尔滨地理距离最远，种群间的遗传距离最大，江西龙南与江西修水地理距离最近，其种群间的遗传差异则最小。因此，如果需要对大猿叶虫品种进行抗性评估，在差异较大的南北之间进行对比实验很有必要。由于实验选取的虫源仅来自于 4 个地点，还不足以根据现在结果准确判断大猿叶虫在全国内的遗传分化情况，因此，下一步有必要扩大实验对象范围，进一步进行遗传分化分析。

参 考 文 献 (References)

Bas B, Dalkilic Z, Peever TL, Nigg HN, Simpson SE, Gmitter FG, Adair RC, 2000. Genetic relationships among Florida *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (3): 459 – 465.

Boyce TM, Zwick ME, Aquado CF, 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevil: Size structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123: 825 – 836.

Cravanzola F, Piatti P, Bridge PD, Ozino OI, 1997. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). *Letters in Applied Microbiology*, 25 (4): 289 – 294.

Dong YK, Zhou YC, Li ZH, Xue FS, 2007. Biological characteristics of the population of *Colaphellus bowringi* in Shandong. *Plant Protection*, 33(2): 70 – 73. [董宇奎，周昱晨，李照会，薛芳森，2007. 大猿叶虫山东种群生物学特性的研究. 植物保护，33(2): 70 – 73]

Hu ZF, Yu HC, Sun WP, Xue FS, 2008. The developmental duration and biological characteristics of *Colaphellus bowringi* in Harbin. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45: 909 – 912. [胡志凤，于洪春，孙文鹏，薛芳森，2008. 哈尔滨地区大猿叶虫发育历期与生物学特性. 昆虫知识，45(6): 909 – 912]

Kim KS, Sappington TW, 2004. Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, 13(3): 293 – 303.

Lai XT, Yang D, Wu SH, Zhu XF, Xue FS, 2008. Diapause incidence of progeny in relation to parental geographic origin, host plant and rearing density in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(2): 117 – 123.

Magana C, Beroiz B, Hernández-Crespo P, Montes de Oca M, Carnero A, Ortego F, Castanera P, 2007. Population structure of the banana weevil, an introduced pest in the Canary Islands, studied by RAPD analysis. *Bulletin of Entomological Research*, 97(6): 585 – 590.

Scataglini MA, Confalonieri VA, Lanteri AA, 2000. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: Evidence of RAPD analysis. *Genetica*, 108(2): 127 – 136.

Taberner A, Dopazo J, Castanera P, 1997. Genetic characterization of populations of a *de novo* arisen sugar beet pest, *Aubeonymus*

mariaefranciscae (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 45(1): 24–31.

Wang XP, Xue FS, Ge F, Zhou CA, You LS, 2004. Effects of thermoperiods on diapause induction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Physiological Entomology*, 29 (5): 419–425.

Wang XP, Xue FS, Hua A, Ge F, 2006. Effects of diapause duration on future reproduction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*: Positive or negative? *Physiological Entomology*, 31(2): 190–196.

Xue FS, Li AQ, Zhu XF, Gui AL, Jiang PL, Liu XF, 2002. Diversity in life history of the leaf beetle, *Colaphellus bowringi* Baly. *Acta Entomologica Sinica*, 45(4): 494–498. [薛芳森, 李爱清, 朱杏芬, 桂爱礼, 蒋佩兰, 刘晓芬, 2002. 大猿叶虫生活史的研究. 昆虫学报, 45(4): 494–498]

Xue FS, Spiath HR, Li AQ, Hu A, 2002. The role of photoperiod and temperature in detemination of summer and winter diapause in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Journal of Insect Physiology*, 48(3): 279–286.

Yang D, Lai XT, Sun L, Xue FS, 2007. Parental effects: Physiological age, mating pattern, and diapause duration on diapause incidence of progeny in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology*, 53 (9): 900–908.

Zhang SM, Zhao YX, 1996. The Geographical Distribution of Agricultural and Forest Insects in China. China Agriculture Press, Beijing. 168–169. [章士美, 赵泳祥, 1996. 中国农林昆虫地理分布. 北京:中国农业出版社. 168–169]

(责任编辑:袁德成)